



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“Producción de embriones *in vitro* con ovocitos obtenidos con tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up en vacas Holstein mestizas”**

Tesis previa a la obtención del Título de  
Médico Veterinario Zootecnista

**AUTOR:** Julio César Romero Tintín

C.I.: 0105587570

**DIRECTOR:** Dr. Luis Rodrigo Galarza Alvarez, Msc C.I.: 0103305405

**CUENCA – ECUADOR**

**2019**



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue valorar la producción de embriones *in vitro* con ovocitos obtenidos mediante tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up (OPU). Para lo cual se emplearon complejos cúmulos ovocitos (COC's) provenientes de nueve novillas Holstein mestizas sometidas a tres protocolos de sincronización de la onda folicular: protocolo 1 (Ablación folicular); protocolo 2 (GnRH); protocolo 3 (Benzoato de estradiol). Seguido de estimulación ovárica con 500 UI de FSH-LH y aspirados mediante OPU 48h posteriores. Se cultivó *in vitro* un total de 154 COC's, de los cuales 55 pertenecieron al tratamiento 1 (Ablación folicular); 49, tratamiento 2 (GnRH) y 50 en T3 (Benzoato de estradiol). Los datos fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 24. Para el análisis de las variables cuantitativas se realizó un ANOVA, y para comparar medias se utilizó la prueba de Tukey al 5%. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en cuanto al porcentaje de maduración obtenido (67,3%, 53,1%, 56%,  $P>0.05$ ), así como, en el porcentaje de ovocitos clivados (59,5%, 65,4%, 57,1%,  $P>0.05$ ). Sin embargo, la técnica de Ablación folicular proporciona embriones de mejor (83,3%) calidad en comparación a los tratamientos de GnRH y Benzoato de estradiol.

**PALABRAS CLAVE:** EMBRIONES, REINICIO DE LA ONDA FOLICULAR, OPU, PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN, OVOCITOS.



## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the production of in vitro embryos with oocytes obtained through three ovarian stimulation protocols and aspirated by Ovum Pick Up (OPU). For which complex oocyte clusters (COC's) were used from nine crossbred Holstein heifers subjected to three follicular wave synchronization protocols: protocol 1 (follicular ablation); protocol 2 (GnRH); protocol 3 (estradiol benzoate). Followed by ovarian stimulation with 500 IU of FSH-LH and aspirated by OPU 48h later. A total of 154 COCs were cultured in vitro, of which 55 belonged to treatment 1 (follicular ablation); 49, treatment 2 (GnRH) and 50 in T3 (estradiol benzoate). The data were processed in the statistical program SPSS version 24. For the analysis of the quantitative variables was performed an ANOVA, and to compare means, was used the Tukey test at 5%. There were no significant statistical differences between treatments in terms of the percentage of maturation obtained (67.3%, 53.1%, 56%,  $P > 0.05$ ), as well as in the percentage of divided oocytes (59.5%, 65.4%, 57.1%,  $P > 0.05$ ). However, the follicular ablation technique provides better (83.3%) quality embryos compared to the treatments of GnRH and estradiol benzoate.

**KEY WORDS:** EMBRYOS, FOLLICULAR WAVE RESTART, OPU, SYNCHRONIZATION PROTOCOLS, OOCYTES.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	14
1.1. OBJETIVOS	16
1.1.1. Objetivo general	16
1.1.2. Objetivos Específicos	16
1.2. HIPÓTESIS	16
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	17
2.1. Fisiología del ciclo estral	17
2.2. Endocrinología del ciclo estral	17
2.3. Dinámica folicular	18
2.4. Protocolos de sincronización del ciclo estral	19
2.5. Control de la actividad luteal	19
2.6. Combinación de GnRH y Prostaglandina para el control de la dinámica folicular	20
2.7. Combinación de progestágenos y ésteres de estradiol	20
2.8. Tratamientos utilizando dispositivos intravaginales	20
2.9. Emergencia de una nueva onda folicular	21
2.10. Estimulación ovárica	22
2.11. Ovum Pick Up (OPU)	22
2.12. Producción <i>in vitro</i> de embriones	23
2.13. Maduración de los ovocitos (MIV)	24
2.14. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) y capacitación espermática	26
2.15. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	27
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
3.1. Materiales	28
3.1.1. Materiales Biológicos	28
3.1.2. Materiales Químicos	28
3.1.3. Materiales de campo	28
3.1.4. Materiales de Laboratorio	29
3.1.5. Materiales de Oficina	29
3.2. Metodología	29



3.2.1.	Área de estudio .....	29
3.2.2.	Unidad experimental .....	30
3.2.3.	Tratamientos .....	31
3.2.4.	Sincronización pre – tratamiento .....	32
3.2.5.	Protocolos de estimulación ovárica .....	32
3.2.6.	Tratamientos experimentales .....	33
3.2.7.	Aspiración folicular y recuperación de ovocitos (OPU).....	33
3.2.8.	Clasificación de los COC´s.....	33
3.2.9.	Maduración de los COC´s (MIV) .....	35
3.2.10.	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) .....	36
3.2.11.	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....	37
3.2.12.	Variables .....	37
3.2.13.	Análisis Estadístico .....	38
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Clasificación morfológica de los COC's según Hasler J. 2007.....	24
<b>Figura 2:</b> Respuesta al proceso de estimulación ovárica en cada tratamiento expresado en número total de folículos visualizados en todo el experimento. .	39
<b>Figura 3:</b> Porcentaje de COC's recuperados en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%.....	40
<b>Figura 4:</b> Número de COC's puestos a madurar in vitro (MIV), por repetición en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%. ....	41
<b>Figura 5:</b> Porcentaje de COC's maduros en cada tratamiento, clasificados de acuerdo a lo descrito por Lorenzo et al., (1994), en cuanto al grado de expansión de las células del cúmulus: Tipo 1 (mínima expansión); Tipo 2 (expansión moderada); Tipo 3 (Expansión máxima). Prueba de Tukey al 5% .....	42
<b>Figura 6:</b> Porcentaje de COC's clasificados como maduros e inmaduros luego del proceso de MIV, en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%.....	43
<b>Figura 7:</b> Porcentaje de COC's que se dividieron (clivaron) luego de la FIV, en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5% .....	44
<b>Figura 8:</b> Porcentaje de embriones en cada tratamiento generados al final del experimento. Prueba de Tukey al 5%. ....	45
<b>Figura 9:</b> Porcentaje de embriones de calidad regular y malos producidos en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5% .....	46



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Conformación de grupos experimentales y repeticiones..... 32

**Tabla 2:** Evaluación de la calidad de los ovocitos (COC's), según lo descrito por Hawk & Wall (42) y la modificación realizada por Samaniego et al. (9). .... 34



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Materiales de laboratorio .....	54
<b>Anexo 2:</b> Protocolo de recuperación de ovocitos .....	55
<b>Anexo 3:</b> Protocolo de producción in vitro de embriones .....	56





## CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

---

Yo, Julio César Romero Tintín en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación ***“Producción de embriones in vitro con ovocitos obtenidos con tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up en vacas Holstein mestizas”***, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 29 de marzo de 2019

Julio César Romero Tintín

C.I: 0105587570



---

## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

---

Yo, Julio César Romero Tintín, autor del trabajo de titulación ***“Producción de embriones in vitro con ovocitos obtenidos con tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up en vacas Holstein mestizas”***, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 29 de marzo de 2019

Julio César Romero Tintín

C.I: 0105587570



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

<b>BE:</b>	Benzoato de estradiol
<b>COC's:</b>	Complejo cumulus ovocito
<b>CL:</b>	Cuerpo lúteo
<b>E2:</b>	Estradiol
<b>FSH:</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>GnRH:</b>	Hormona liberadora de Gonadotropinas
<b>IM:</b>	Intramuscular
<b>LH:</b>	Hormona Luteinizante
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>ml:</b>	Mililitro
<b>mm:</b>	Milímetro
<b>OPU:</b>	Ovum Pick-Up
<b>PBS:</b>	Solución Buffer Fosfato
<b>PGF:</b>	Prostaglandina
<b>PIV:</b>	Producción <i>in vitro</i> de embriones
<b>P4:</b>	Progesterona
<b>TE:</b>	Transferencia de embriones
<b>UI:</b>	Unidades Internacionales
<b>µg:</b>	Microgramos



## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios por siempre darme la fuerza y el amparo para poder lograr mis objetivos y por darme una vida rodeado de personas maravillosas.*

*A mi padre Juan por los consejos y por toda la confianza que puso en mí, dándome su apoyo incondicional en todo momento.*

*A mi madre por haberme inculcado buenos valores como la humildad y por brindarme su confianza, enseñándome siempre a esforzarme para lograr mis propósitos.*

*A mis hermanos por siempre creer en mí ayudándome y apoyándome en los momentos difíciles.*

*Al doctor Luis por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo, por apoyarme en todo momento y compartir sus amplios conocimientos y consejos en todo momento, gracias por darme su confianza.*

*A todos mis amigos que siempre están ahí apoyándome, gracias por compartir una etapa maravillosa en tan prestigiosa universidad*



## **DEDICATORIA**

La presente tesis va dedicada a mi madre Teresa por brindarme su apoyo a cada momento apoyarme en mi formación como profesional y por sobre todo siempre creer en mí.

Todo lo que he logrado se lo debo a mi madre.



## 1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIV) es una biotecnología de gran importancia que permite el mejoramiento genético en las ganaderías (1). La International Embryo Technology Society (IETS) durante el año 2015 reportó 630.202 embriones producidos *in vitro* y transferidos, en comparación con los 109.205 embriones transferidos en 2001, lo que representa un aumento sustancial en aproximadamente el 500%, evidenciando la gran demanda de embriones producidos por esta biotecnología (2).

Existen dos fuentes de ovocitos para la producción de embriones como son: ovocitos recuperados de vacas faenadas y los provenientes de animales vivos, en los cuales la recuperación se realiza por aspiración ecoguiada (OPU). La técnica de aspiración folicular mediante Ovum Pick Up (OPU), fue desarrollada en la década de los 80's con el fin de obtener ovocitos de manera menos traumática; por lo tanto, es menos invasiva, y se puede realizar sin un estímulo hormonal previo (1).

En los últimos años los avances en el área de la reproducción han permitido la combinación de dos biotecnologías como OPU y la PIV; sin embargo, la aspiración de ovocitos por OPU reduce la calidad y cantidad de COC's recuperados, y esto afecta el porcentaje final de embriones producidos *in vitro* en un 10 a 20 % aproximadamente, en comparación con los ovocitos provenientes de ovarios de matadero en los cuales se obtiene un mayor número de ovocitos tipo A y B y por ende ovocitos viables para protocolos de PIV. (2)

Actualmente se han venido trabajando varios protocolos de estimulación ovárica para mejorar la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por OPU. (3) Así pues, se han descrito protocolos de estimulación hormonal con FSH a diferentes horas y posterior aspiración folicular (OPU) en distintos tiempos con el fin de determinar el momento adecuado para aumentar el número de ovocitos viables para la producción de embriones *in vitro* (4). Sin embargo, otros autores mencionan que la estimulación ovárica con FSH permite el desarrollo asincrónico del ovocito y el folículo por lo cual ellos proponen utilizar una combinación de FSH-LH. (5)



Además, factores como la raza, el sistema de manejo, la alimentación y el medioambiente pueden alterar el patrón de comportamiento del ovario, disminuyendo la efectividad de los protocolos de estimulación ovárica y por ende la calidad y cantidad de ovocitos competentes para PIV (6), (7), (8). Por otra parte, en Ecuador y más aún en la zona Sierra, existe poca información sobre la combinación de estas dos biotecnologías (OPU-PIV). Algunos estudios realizados describen que la estimulación ovárica con FSH-LH 48 horas antes de OPU permitió obtener mayor número de COC's recuperados, aptos para la PIV. (9)

Estos resultados permiten visualizar que la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados por OPU, repercutirán sobre el resto de momentos de la PIV, como la maduración y posterior fecundación de los ovocitos bovinos (10). Por lo tanto, es imprescindible valorar la combinación de estas dos biotecnologías como la OPU-PIV, en animales de genotipo Holstein mestizos, sometidos a un sistema de explotación extensivo en la zona Sierra y previa estimulación ovárica con tres protocolos diferentes.



## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo general**

Valorar la producción de embriones *in vitro* con ovocitos obtenidos mediante tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up en vacas Holstein mestizas.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Establecer el número y calidad de blastocistos producidos *in vitro* con material obtenido mediante Ovum Pick Up.
- Evaluar la efectividad del proceso de producción *in vitro* de embriones expresada en el porcentaje de maduración (MIV) y porcentaje de ovocitos clivados.

## **1.2. HIPÓTESIS**

Los tratamientos de estimulación ovárica utilizados para obtener ovocitos mediante aspiración folicular ecoguiada (OPU), en vaquillas Holstein mestizas influyen sobre el porcentaje de embriones obtenidos *in vitro* (PIV).





## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Fisiología del ciclo estral**

La fisiología reproductiva del ganado bovino especialmente lo relacionado con la función ovárica y el ciclo estral, el mismo que se puede definir como un proceso dinámico y continuo en el que interaccionan varios órganos, además es el periodo que transcurre entre celo y celo, (11). Cada ciclo estral clásicamente está dividido en fase folicular y una fase lútea, así mismo su periodo de duración es de 21 días con variaciones de 18 a 24 días con tendencia a ser más corto en novillas y se mantiene hasta una edad de 10 a 15 años. Está regulado por una interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (ovario y útero). (12)

### **2.2. Endocrinología del ciclo estral**

El hipotálamo forma la base del cerebro y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotrofinas o GnRH, esta se difunde a los capilares y de ahí a las células de la adenohipófisis en donde estimula la secreción de hormonas hipofisiarias (FSH y LH) (13). Ambas estructuras no se comportan solamente como productoras de hormonas, sino también como órganos blancos creando un sistema de retroalimentación homeostático.(14)

Estas dos hormonas son secretadas a la circulación en forma de pulsos y reguladas por dos sistemas el tónico y cíclico. El sistema tónico produce a nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisiarias las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas. El sistema cíclico opera más gradualmente siendo evidente solo por 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos, su función primordial es causar la ovulación (12). La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular (13). Por su parte la LH interviene en el proceso de ovulación formación y mantenimiento del cuerpo lúteo, y la formación de androstenediona a partir de colesterol que posteriormente bajo la influencia de la FSH se forme estradiol. Este estradiol ejerce efecto de retroalimentación positivo sobre hipotálamo e hipófisis



aumentando los pulsos de GnRH promoviendo la liberación del LH y la ovulación acompañado de los síntomas de celo. Otra de las hormonas producidas por el hipotálamo es la oxitocina que interviene en procesos de parto, bajada de la leche, transporte de espermatozoides en el útero, así como también en procesos de luteólisis. (11)

### **2.3. Dinámica folicular**

La dinámica folicular se puede definir como el proceso de crecimiento continuo y de regresión de folículos antrales que conlleva al desarrollo del folículo preovulatorio. Este crecimiento ocurre en ondas como el reclutamiento, selección y dominancia para describir el desarrollo de folículos antrales. Hoy en día se conoce cuatro fases: reclutamiento en la que los folículos responden al estímulo de la FSH, selección continúan su crecimiento, desviación cuando los folículos dominantes divergen de los subordinados y dominancia que es cuando alcanza un crecimiento adecuado y secreción de sustancias para inhibir el siguiente reclutamiento folicular y la consiguiente onda. (15)

Durante cada ciclo estral los ovarios bovinos sintetizan y secretan estrógeno y progesterona, entre otros productos, los cuales coordinan la función del sistema reproductor femenino. Cada ciclo estral comprende dos fases: la fase folicular y la fase luteal. La fase folicular o estrogénica se caracteriza por el desarrollo de un folículo preovulatorio y la secreción de estrógeno por parte de ese folículo. (16)

Por su parte, la fase luteal se caracteriza por la secreción de progesterona, la cual es producida por el cuerpo lúteo que se formó después de la ovulación del folículo preovulatorio. Al final de la fase luteal, entre los días 15 a 17 del ciclo, si la vaca no quedó gestante, el cuerpo lúteo inicia su regresión por acción de la prostaglandina, lo cual permite que se inicie el desarrollo del nuevo folículo preovulatorio. (15)

Mediante el uso de ultrasonografía ha sido posible determinar que los folículos bovinos se desarrollan en ondas, además que en cada ciclo estral se producen ondas foliculares que pueden variar entre 1 a 3. Estas ondas inician cuando un grupo de folículos antrales inician su crecimiento hasta los 4 mm, esta etapa se



denomina reclutamiento, posteriormente viene la etapa de selección de un folículo dominante que continúa su crecimiento, mientras que los demás folículos se convierten en atrésicos o subordinados, en la etapa de dominancia este folículo alcanza un diámetro de 10 mm (17). La emergencia de la primera onda folicular ocurre después de la ovulación, mientras que la segunda onda ocurre entre los días 9 o 10 en ciclos de 2 ondas y 8 o 9 en los de 3 ondas, destacando que la tercera onda ocurre entre los días 15 y 16. (18)

#### **2.4. Protocolos de sincronización del ciclo estral**

A partir del descubrimiento de las hormonas de la reproducción el hombre siempre ha buscado una mejora y un control sobre la actividad reproductiva, mediante el uso de la ultrasonografía para estudiar el efecto de distintos tratamientos hormonales sobre la dinámica folicular permitió el desarrollo de protocolos que permitan ser más eficientes en el manejo y control del ciclo estral y la ovulación. Hoy en día existen numerosos protocolos de sincronización de celos y ovulación presentando distintas ventajas, así como inconvenientes. Por tal motivo es indispensable un conocimiento profundo de la fisiología reproductiva con el fin de determinar el protocolo más adecuado para los animales dependiendo de la zona en la que se encuentre. (19)

#### **2.5. Control de la actividad luteal**

La prostaglandina ha sido la hormona de elección para provocar lisis del cuerpo lúteo, su respuesta a la administración será diferente en los distintos estadios del ciclo estral. Del día 1 a 5 no existe respuesta debido a que el cuerpo lúteo está en desarrollo y se ha producido la ovulación, días 6 a 7 la respuesta es parcial, entre los días 8 a 17 el cuerpo lúteo está desarrollado y es sensible a los efectos de la prostaglandina, finalmente entre los días 18 a 21 el cuerpo lúteo está en regresión. (20)

Una de las primeras metodologías implementadas con prostaglandinas consiste en la inyección de dos dosis separadas por 11 días, al inyectar la primera dosis los animales responderán o no con manifestación o celo según el momento del ciclo estral, 11 días después los animales se encontrarán en la fase luteal por lo que serán sensibles al efecto luteolítico de la hormona, presentando ovulación y



manifestación de celo.(21) Luego de administrada la segunda dosis el celo se produce por un periodo de 3 a 5 días. (22)

## **2.6. Combinación de GnRH y Prostaglandina para el control de la dinámica folicular**

La utilización de GnRH para manipular el desarrollo folicular se basa en la inducción de un pico de LH y por ende la ovulación del folículo dominante, resultando en ovulación, formación de un cuerpo lúteo accesorio y una nueva onda folicular 2 o 3 días después. (19) Posteriormente se desarrolló el protocolo Ovsynch, el mismo se basa en la administración de GnRH, 7 días después aplicación de PGF, GnRH 48 a 56 horas después e inseminación artificial 15 horas después. (23)

## **2.7. Combinación de progestágenos y ésteres de estradiol**

Inicialmente la combinación de E2 y P4 tenía como objetivo principal provocar la regresión del cuerpo lúteo, posteriormente se descubrió que dicha combinación causa la atresia del folículo dominante y posteriormente la formación de una nueva onda folicular, mediante la supresión de FSH y LH por el tiempo en el que es metabolizado el estradiol. Al finalizar dicho proceso surge un nuevo pico de FSH provocando la formación de una nueva onda folicular. (24)

## **2.8. Tratamientos utilizando dispositivos intravaginales**

En la actualidad existen dispositivos intravaginales a base de progesterona con cantidades que oscilan en 0,5 g a 1,9 g. Esta hormona contribuye a la supresión de la frecuencia de los pulsos de LH, provocando que el folículo dominante detenga su desarrollo y dando lugar a la formación de una nueva onda folicular, a causa de la disminución de los niveles de E2 e inhibina y aumentando los niveles circundantes de FSH. El tratamiento usado con más frecuencia consiste en administrar 2 mg de benzoato de estradiol al momento de la inserción del dispositivo (día cero), posteriormente al remover dicho dispositivo administrar PGF que puede ser en el día 7 u 8, 24 horas después aplicar 1mg de benzoato de estradiol, por último, se puede realizar la inseminación artificial (IA) entre las 50 y 56 horas. (17,24)



## **2.9. Emergencia de una nueva onda folicular**

Los diferentes métodos de manipulación de la dinámica folicular son de gran ayuda ya que nos permite adecuar el momento de inicio de los distintos métodos de superovulación, así como también de recuperación de estructuras, producción de embriones. Este método de ajuste de la dinámica folicular y sincronización de una nueva onda folicular mediante la eliminación de los folículos de mayor diámetro se pueden realizar mediante el empleo hormonas o también métodos físicos. (25)

La aplicación de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), en protocolos de superovulación tiene como objetivo principal provocar el pico preovulatorio de LH en un momento determinado con el fin de producir una ovulación más sincrónica. (19) Los protocolos que tienen como base la aplicación de GnRH o sus análogos, la emergencia de una nueva onda folicular ocurre aproximadamente en 1,5 a 2 días (25). GnRH o su análogo se han administrado en el periodo comprendido entre las 48 horas post – inyección de PGF y las 24 horas de iniciado el celo, modificando la respuesta superovulatoria y obteniendo una mayor tasa de fecundación y mayor número de embriones viables. (26)

El benzoato de estradiol es una hormona esteroidea secretada por el folículo ovárico, su función principal es optimizar los resultados reproductivos de los tratamientos con progesterona en bovinos. Su uso al momento de la aplicación de un implante a base de progesterona provoca el inicio de una nueva onda folicular y su segunda aplicación 24 horas después de la extracción del implante provoca luteólisis y el pico preovulatorio de LH, a través del feed back positivo sobre GnRH y LH induciendo la ovulación. (27)

Por otra parte, el empleo de métodos físicos como la Ablación folicular para adecuar la dinámica folicular ocurre de manera inmediata, provocando un aumento en los niveles de FSH en un corto periodo de tiempo y emergencia de una nueva onda folicular en 1,5 días después de la eliminación de los folículos independientemente del estado del ciclo estral en que se encuentre el animal. (25)



## **2.10. Estimulación ovárica**

La aplicación de FSH - LH como tratamientos hormonales son ampliamente empleados, sin embargo, son necesarias las modificaciones en dichos protocolos, por ejemplo, en las dosis y duración de los tratamientos, porque el objetivo principal de la estimulación ovárica mediante tratamientos hormonales previa a OPU es generar folículos adicionales, en lugar de provocar ovulación. La aplicación de FSH a distintas dosis en bovinos incrementa el número de folículos aspirados y de ovocitos recuperados, además de proporcionar un mayor porcentaje de embriones transferibles en comparación con animales no estimulados. (28)

Por otra parte, se ha mencionado que existe asincronía entre la maduración de los ovocitos y la del folículo o entre la maduración nuclear o citoplasmática, al utilizar FSH sola para estimulación ovárica (29). Una dosis de FSH – LH acompañado de un protocolo adecuado para una respuesta ovárica efectiva a la superovulación. La FSH estimula el crecimiento folicular y la LH para obtener múltiples ovulaciones. (30)

## **2.11. Ovum Pick Up (OPU)**

La punción folicular para la recolección de ovocitos en animales vivos permite la modulación endocrina de la actividad ovárica influyendo directamente sobre la cantidad y calidad de los complejos cumulus ovocito (COC's) recuperados. Entre las ventajas de OPU nos permite obtener información adicional sobre el momento de recolección del ovocito, como también conocer los valores endocrinos de la sangre, para ganar más información sobre la donante y su posible efecto directo sobre la calidad de los ovocitos. (31)

Los factores principales que controlan el resultado en cuanto al número y calidad de los ovocitos recuperados por OPU se pueden dividir en dos principales categorías. La primera incluye aspectos técnicos, como el método de punción, los materiales utilizados como agujas, la presión aplicada. La segunda categoría se puede atribuir a los factores biológicos como el estímulo hormonal, el estado del ciclo estral, la edad, raza, condición corporal. (32)



El éxito de OPU es medido por la tasa de recolección de los COC's influenciada por el diámetro de la aguja, el nivel de vacío y la experiencia del operador. Además, se ha sugerido que la frecuencia de OPU a un intervalo de 7 días o más entre sesiones, permitiendo así el desarrollo del folículo dominante ya que intervalos cortos tiene una influencia perjudicial sobre los ovocitos recuperados, los mismo siendo de menor calidad. (33)

## **2.12. Producción *in vitro* de embriones**

La biotecnología de la reproducción comprende varias técnicas (desde la inseminación artificial hasta la clonación) o conjunto de ellas que permiten aumentar la eficiencia de reproductiva de los animales. Las técnicas tienen mucha importancia y pueden ser empleadas, además, como herramienta en la aplicación de otras técnicas más modernas. en el caso de la transferencia de embriones esta puede ser catalogada como indispensable en la aplicación de la producción *in vitro* de embriones.(34)

La producción *in vitro* de embriones (PIV) consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar los resultados al final del procedimiento. Estas etapas son: obtención, selección de ovocitos, maduración *in vitro* (MIV), y cultivo *in vitro* (CIV). La obtención de ovocito se realiza a través de dos procedimientos. A partir de ovarios de matadero y aspiración de sus folículos comprendidos en un diámetro entre 2 a 8 mm, y a partir de animales vivos utilizando la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido (Ovum Pick Up), la misma que fue descrita por primera vez por Pieterse *et al.* (5) En OPU se trabaja con ovocitos de animales de genética conocida consiguiéndose un mayor número de embriones respecto del obtenido mediante protocolos estándar como transferencia de embriones, así mismo la aplicación conjunta de tecnologías como OPU/PIV permiten una mayor producción de embriones por vaca al año. (35)

Una mejora significativa para el rendimiento y calidad de los ovocitos y la producción de embriones ha sido la pre-estimulación hormonal previa a Ovum Pick Up mediante el uso de gonadotropinas. Blondin *et al.* (36), observaron que el mejor desarrollo aparece cuando la estimulación se efectúa 48h antes de la aspiración. Por su parte Chaubal *et al.* (33) realizaron un estudio comparativo

entre sistemas OPU en animales con y sin estimulación hormonal concluyendo que la retirada del folículo dominante seguida de administración de FSH y OPU a las 48h, fue el mejor protocolo en base a la respuesta folicular, recuperación de ovocitos y producción de embriones.

A nivel de laboratorio para la selección de los ovocitos se utiliza la escala más común la misma que valora entre 1 - 5 considerando las características del cumulus y de citoplasma. (37)

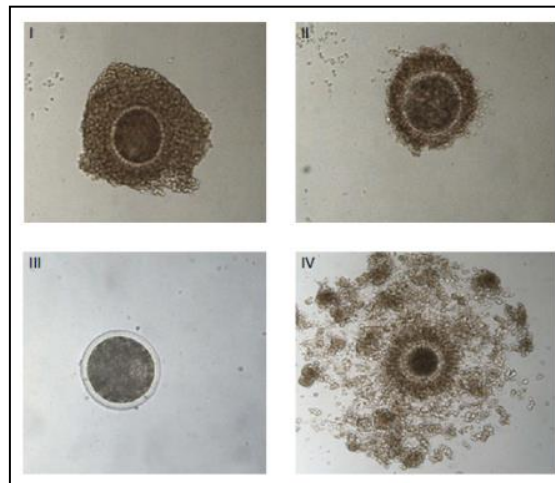
**Tipo A o Categoría I:** Ovocito con más de cuatro capas, cumulus compacto, citoplasma homogéneo y uniformemente granulado.

**Tipo B o Categoría II:** Ovocitos con menos de tres en su cumulo, citoplasma homogéneo.

**Tipo C o Categoría III:** Ovocitos con mono capa de células del cumulus y citoplasma de apariencia irregular con áreas oscuras.

**Tipo D o Categoría IV:** Ovocito desnudo.

**Tipo E o Categoría V:** Ovocitos maduro con células del cumulus expandido. (37)



**Figura 1:** Clasificación morfológica de los COC's según Hasler J. 2007.

### 2.13. Maduración de los ovocitos (MIV)

En la especie bovina se puede inducir maduración (MIV), de los ovocitos aspirados de cualquier onda en crecimiento folicular en aproximadamente 24





horas, a la vez que puede ser inducida por una amplia variedad de medios. Los ovocitos obtenidos de folículos menores de 2mm de diámetro presentan bajas tasas de MIV comparados con los ovocitos de folículos más grandes. En la recolección por OPU de donadoras vivas no todos los ovocitos son aptos para el tratamiento *in vitro*. La condición reproductiva de la donadora, el tamaño, la edad del folículo y la técnica de OPU empleada puede afectar el tipo y la calidad de los ovocitos recuperados y por lo tanto la tasa de éxito de la MIV. (38)

La función del ovocito es constituirse en el futuro embrión. Ese proceso se establece de forma gradual durante la ovogénesis, a través de la configuración celular y molecular que le otorgan la capacidad de completar la meiosis, garantizar la fecundación monospermica, formar el núcleo del espermatozoide en pronúcleo masculino y cumplir las fases de desarrollo de acuerdo a la expresión de moléculas maternas de ARNm y proteínas en un producto sano. (19)

El ovocito en el folículo ovárico preovulatorio de una vaca cíclica, inicia la maduración final con la onda preovulatoria de LH, para progresar del estadio de profase I a metafase II en las 20 a 24 horas siguientes. *In vitro* el inicio de la meiosis ocurre en forma espontánea, en el momento en que el ovocito es separado del folículo no ovulatorio (2 a 8 mm) y alcanza la metafase II luego de 18 a 24 horas de cultivo. (19)

*In vivo*, el ovocito sufre cambios bioquímicos y metabólicos desde el estadio de profase I hasta el ovocito maduro para la fecundación. Las gonadotrofinas participan activamente en el desarrollo y maduración. Basado en este principio, el empleo de gonadotrofinas bovinas y de otras especies se ha generalizado en los suplementos de medios de maduración. (19)

La maduración ovocitaria se puede definir como un fenómeno en el cual el ovocito progresa desde el estadio de profase de MI hasta el de MII, completando este fenómeno al existir un pico ovulatorio de LH o cuando es extraído del folículo y colocado para la maduración *in vitro* permaneciendo un periodo de 24 horas para completar la maduración nuclear y citoplasmática, esta última de vital importancia ya que prepara al ovocito para soportar la fertilización y aportar nutrientes para la formación embrionaria. (39)



La primera modificación visible del núcleo es la condensación de la cromatina y la disolución de la membrana nuclear, proceso conocido como ruptura de la vesícula germinativa. La última manifestación de la maduración nuclear culmina con el final de la meiosis y la presencia de dos corpúsculos polares (CPs). Estas diferencias para completar la meiosis del ovocito *in vivo* e *in vitro* marcan el punto de partida de las etapas claves de desarrollo del ovocito, para comprender los fenómenos que afectan la maduración *in vitro*, y dependiendo de ella la producción de blastocistos transferibles. (19)

La maduración es de 24 horas. El medio tradicional y más empleado es el TCM-199 (tissue culture médium), suplementado con piruvato, lactato, vitaminas aminoácidos, purinas, proteínas como suero fetal que contiene 10% Albumina Sérica Bovina (BSA), 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, gonadotropinas 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina a una temperatura de 38.5°C en una atmosfera con 5% CO<sub>2</sub>. (19)

#### **2.14. Fecundación *in vitro* (FIV) y capacitación espermática**

En 1977, la fecundación *in vitro* se logró por primera vez en la especie bovina utilizando semen capacitado en el oviducto o el útero de vacas en estro. El primer becerro nacido vivo de FIV en 1981 fue el resultado de la transferencia de un embrión de cuatro células en el oviducto de una vaca receptora. (34)

Es en la fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos donde se observan diferencias más claras entre especies. La FIV en el bovino presenta un desafío diferente al encontrado con la utilización de la inseminación artificial tradicional *in vivo*. La exposición de ovocitos maduros con un número insuficiente de espermatozoides produce una sensible disminución en la tasa de fecundación. En contraste el uso de concentraciones más altas que las óptimas resultan en la producción de embriones polispérmicos; la polispermia resulta en la obtención de cigotos poliploides, los cuales no son viables para continuar su desarrollo embrionario. (38)



La fecundación *in vitro* comprende una serie de procesos cuyo objetivo final es la fusión de los núcleos de ambas gametas y la formación del genoma del nuevo individuo. El medio de fecundación es un medio Tirodes suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato); además se le agregan heparina (30 µl de la solución final), adrenalina e hipotaurina, 15 µl de la solución final. El tiempo de fecundación es de 20-24h bajo las mismas condiciones de cultivo que durante la maduración de los ovocitos. La penetración del espermatozoide activa la segunda división meiótica con la expulsión del segundo corpúsculo polar. (40)

### **2.15. Cultivo *in vitro* (CIV)**

El cultivo *in vitro* comprende distintas fases desde que tiene lugar la fecundación hasta el estadio de blastocisto. En el cultivo de embriones de las especies mamíferas se han desarrollado diversos tipos de sistemas *in vitro*. Existen diferentes alternativas tanto en el sistema de cultivo utilizado (mezcla de gases, aceite mineral, número de embriones), o en la composición del medio, así como en la dinámica del cultivo. (38)

Existen diferentes sistemas de cultivo embrionario que pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su formulación: indefinidos, cuando se utiliza suero o cultivo con células somáticas, semidefinidos cuando se omite el cultivo y el suero se reemplaza por albumina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas sintéticas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona. (41)

Posteriormente se puede realizar la primera evaluación morfológica a las 90h después de la fecundación, en ese momento se puede encontrar embriones en estadio de 6 a 12 células. La composición de las diferentes formulaciones empleadas en el cultivo de estadios embrionarios tempranos se trata básicamente de una solución salina suplementada con una fuente de energía (piruvato, glucosa o lactosa) y una fuente proteica (suero o albumina sérica bovina). Existen algunos medios como TCM-199 que contienen vitaminas y aminoácidos en número y concentración variable y otros simples que se suplementan con aminoácidos (SOFaa). Así también, otra amplia variedad de componentes como iones, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. (40)



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Materiales Biológicos**

- Hormonas
  - FSH-LH (Pluset®)
  - GnRH
  - Benzoato de estradiol
  - Prostaglandina
  - Implantes de progesterona

##### **3.1.2. Materiales Químicos**

- Gel
- Alcohol 70%
- Medio de recolección
- Lidocaína
- Heparina
- Yodo
- Amonio cuaternario
- Gel desinfectante
- Xilacina

##### **3.1.3. Materiales de campo**

- Jeringas de 3, 5, 10 y 20 ml.
- Guantes de inspección
- Guantes de chequeo ginecológico
- Overol
- Sogas
- Recipientes
- Toallas desechables
- Dispositivo para insertar los implantes de progesterona
- Aguja Desechable 18 G



- Tubos Falcón
- Equipo de ultrasonido Aloka SSD ProSound2®
- Transductor sectorial
- Porta sonda de ultrasonido
- Bomba de Aspiración
- Sistema de Guía de Aguja con aguja larga desechable 20 G
- Set de mangueras
- Tubos vacutainer de tapa roja con gel
- Jabón
- Filtro EMCON

#### **3.1.4. Materiales de Laboratorio**

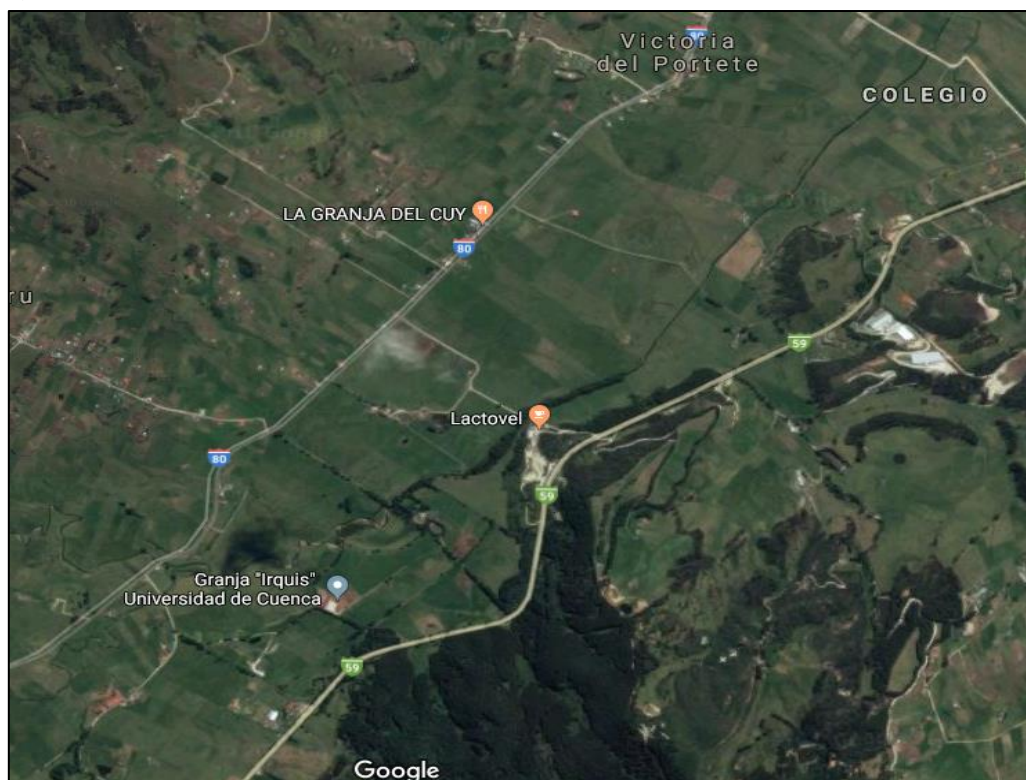
- Pipetas automáticas
- Placas Petri con cuadrículado
- Estéreo microscopio
- Filtros
- Baño María
- Platina de calefacción
- Medios para MIV, FIV y CIV

#### **3.1.5. Materiales de Oficina**

- Cuaderno de campo
- Libreta
- Esferos
- Medios Extraíbles (USB)
- Calculadora
- Marcadores

### **3.2. Metodología**

#### **3.2.1. Área de estudio**



**Imagen 1:** Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.

**Fuente:** Directorio cartográfico de Google Maps, 2018.

El proyecto se llevó a cabo entre los meses de septiembre y noviembre, en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca ubicada en la Granja de Irquis, área que se encuentra en la jurisdicción política de la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete cuya Latitud sur: 4'48.34" S y Longitud Oeste 79° 4'30.12" O. Las condiciones meteorológicas donde se realizó el proyecto son: altitud de 2671 m.s.n.m.; pluviosidad anual entre 800 mm y 2000 mm, humedad relativa del 80% y temperaturas que oscilan entre 7 y 12 ° C.

### 3.2.2. Unidad experimental

Para el estudio se emplearon un total de 154 COC's de los cuales 55 procedían del tratamiento denominado Ablación folicular (G1), 49 fueron del grupo 2 (GnRH) y 50 del que se aplicó Benzoato de Estradiol. Los complejos Cumulus-Ovocitos (COC's), fueron obtenidos de nueve novillas de genotipo Holstein mestizas, de las Granjas Experimentales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, durante tres repeticiones, las



mismas tenían un peso promedio de  $427.7 \pm 23.03$  kg, condición corporal de  $2.75 \pm 0.09$  valorado en una escala de 1 a 5, edad promedio de  $26.7 \pm 1.45$  meses. Previo a la aplicación de los protocolos y sesiones de OPU fueron sometidas a un análisis del estado reproductivo de cada animal.

Los animales fueron manejados bajo un sistema de pastoreo rotacional, alimentados con pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), suplementadas con sales minerales.

### 3.2.3. Tratamientos

Los complejos cumulus ovocitos para la producción *in vitro* de embriones fueron provenientes de tres tratamientos, uno mecánico y dos farmacológicos

**Tratamiento 1:** Un total de 55 complejos cumulus ovocitos (COC's), procedentes de un protocolo a base de Ablación de los folículos >5mm (día 0) + FSH-LH (Pluset®) 500 UI, (48h pos ablación) + OPU 48h después de la aplicación de FSH-LH.

**Tratamiento 2:** Un total de 49 complejos cumulus ovocitos (COC's), procedentes de un protocolo a base de GnRH; Gonadorelina 250 mcg, IM (día 0) + 500 UI de FSH-LH (Pluset®) IM, (72h posteriores) + OPU 48h después de la aplicación de FSH-LH.

**Tratamiento 3:** Un total de 50 complejos cumulus ovocitos (COC's), procedentes de un protocolo a base de Benzoato de estradiol 2mg, IM (día 0) + FSH-LH (Pluset®) 500 UI, (72h posteriores) + OPU 48h después de la aplicación de FSH-LH.



**Tabla 1.** Conformación de grupos experimentales y repeticiones

	PRIMERA REPETICIÓN				SEGUNDA REPETICIÓN				TERCERA REPETICIÓN		
TRATAMIENTO 1	V 1	V 2	V 3		V 4	V 5	V 6		V 7	V 8	V 9
TRATAMIENTO 2	V 4	V 5	V 6		V 7	V 8	V 9		V 1	V 2	V 3
TRATAMIENTO 3	V 7	V 8	V 9		V 1	V 2	V 3		V 4	V 5	V 6

\*V= Vaquilla

### 3.2.4. Sincronización pre – tratamiento

Todas las novillas fueron sometidas a un protocolo de sincronización estándar previo iniciar cada tratamiento, para obtener una uniformidad en su ciclo estral.

Día 0=implante de progesterona (CIDR de 1,9g) + 2mg de benzoato de estradiol (IM), día 7 se retiró el implante + 25 mg de Prostaglandina, (IM) + parches adhesivos detectores de celo. Día 8 1mg de benzoato de estradiol. El día 6 pos-celo fue considerado como día cero para el inicio de los tratamientos de reinicio de onda folicular y estimulación ovárica. En este día se ecografió para verificar la presencia de cuerpo lúteo (CL) y folículo dominante (FD).

### 3.2.5. Protocolos de estimulación ovárica

El estudio contó con COC's obtenidos mediante OPU de tres tratamientos (protocolos) y tres repeticiones (sesiones).

- **Protocolo 1 (G1)**

Día cero=Ablación de los folículos >5mm (día 0) + 500 UI de FSH-LH (Pluset®) IM (48h pos ablación) + OPU 48h después de la aplicación de FSH-LH.

- **Protocolo 2 (G2)**

Día cero=GnRH; Gonadorelina 250 mcg, IM + 500 UI de FSH-LH (Pluset®) IM, (72h posteriores) + OPU 48h después de la aplicación de FSH-LH.

- **Protocolo 3 (G3)**

Día cero=Benzoato de estradiol 2mg, IM (día 0) + 500 UI de FSH-LH (Pluset®) IM, (72h posteriores) + OPU 48h después de la aplicación de FSH-LH.





### 3.2.6. Tratamientos experimentales

El experimento comparó tres tratamientos (procedencia de los COC's) en la producción *in vitro* de embriones bovinos:

**Tratamiento 1 (G1):** COC's obtenidos de un protocolo 1 (Ablación folicular), anteriormente descrito y recuperados mediante Ovum Pick Up (OPU); n=55

**Tratamiento 2 (G2):** COC's obtenidos de un protocolo 2 (GnRH) anteriormente descrito y recuperados mediante Ovum Pick Up (OPU); n=49

**Tratamiento 3 (G3):** COC's obtenidos de un protocolo 3 (Benzoato de Estradiol), descrito anteriormente y recuperados mediante Ovum Pick Up (OPU); n=50

### 3.2.7. Aspiración folicular y recuperación de ovocitos (OPU)

Los ovocitos empleados para la maduración se recuperaron mediante OPU, técnica descrita por Chaubal *et al.*(4), que consiste en el empleo de un ecógrafo equipado con un transductor sectorial de 5 MHz, ensamblado en un soporte que contiene la guía de punción conformada por una aguja descartable de calibre 18G o (1,2x75 mm) conectada bomba de aspiración para crear un vacío de 60-70 mm de Hg, generando un flujo de fluido de 10-15 ml por minuto. Las novillas previamente tranquilizadas con Xilacina 2% a una dosis de 0,02 mg/kg IM, seguido del vaciamiento del contenido rectal y posteriormente se aplicó ml (dosis 0,3 mg/kg) de Lidocaína 2% en el espacio epidural caudal antes de OPU.

Los folículos ováricos se visualizaron en el monitor de ultrasonido. Fueron contados, registrados para luego ser aspirados los folículos de 5-8mm (>5mm) de tamaño. El medio de recolección de ovocitos fue PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, P-4417) suplementado con heparina (2,2 U. l/ml) atemperado a 37°C. Inmediatamente después de la aspiración, el material obtenido fue llevado al laboratorio en un tubo falcón de 50 ml donde se procedió a filtrar el contenido del tubo con un filtro EMCON.

### 3.2.8. Clasificación de los COC's

El material filtrado fue transferido a una placa Petri cuadriculada de 95 mm y mediante un estereoscopio se realizó la búsqueda y selección de los complejos

cúmulos ovocitos (COC's). Estos fueron clasificados morfológicamente según el criterio de evaluación descrito por Hawk & Wall (42); y modificado por Samaniego et al. (43) ; quienes agrupan finalmente en COC's aptos (Tipos A y B) y no aptos (Tipos C).

Los COC's pasaron por un proceso de lavado en medio H-SOF (3 lavados sucesivos en gotas de 100ul) con el fin de librarlos de detritos tisulares, coágulos, etc.

**Tabla 2:** Evaluación de la calidad de los ovocitos (COC's), según lo descrito por Hawk & Wall (42) y la modificación realizada por Samaniego et al. (9).

<i>Hawk &amp; Wall (1994)</i>			<i>Samaniego et al., 2017</i>
Tipo de ovocito	Características del cumulo	Características del ovocito	Tipo de ovocito
Calidad buena (A)	Compacto, con varias capas de células, con granulosa adherida; el citoplasma se ve claramente	Homogéneo denso y finamente granulado.	Aptos (Tipo A y B)
Calidad intermedia (B)	Grueso, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cumulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.	

Rechazados (C).	Parcial o completamente expandido con cumulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cumulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cumulo; ovocitos desnudos	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.	No aptos (Tipo C)
-----------------	--	---	-------------------

*Fuente: Autor*

### 3.2.9. Maduración de los COC's (MIV)

Los ovocitos de cada tratamiento (T1; T2 y T3) fueron puestos en medio de maduración y posteriormente colocados en la cámara de CO<sub>2</sub>. Se registró la hora de colocación en el medio. Previamente los ovocitos fueron lavados dos veces en medio de maduración.

El medio de maduración consiste en TCM 199 suplementado con 10% Albumina Sérica Bovina (BSA), 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina.

Se realizó microgotas (50ul) con el medio de maduración, tres gotas en cada placa Petri de 25mm, en estas se depositaron de 10-12 COC's de cada grupo experimental, los mismos que fueron puestos en una estufa de CO<sub>2</sub> al 5%, Humedad del 90% y 38.5 °C de Temperatura por 18-24 horas.

Posteriormente se realizó la evaluación del estado de maduración en base a la expansión de las células del cumulus contabilizando el número de ovocitos expandidos y clasificando en base a las escalas de maduración descritas por Lorenzo et al. (44),



Los criterios utilizados para describir la maduración de los COC's fueron un sistema de puntuación subjetivo en el que: 0 no indicó respuesta detectable, catalogado como un ovocito no viable; tipo uno (+) indica el mínimo respuesta observable, tipo dos (++) significa expansión moderada y tipo tres (+++) indica el grado máximo de expansión, donde todas las capas de cúmulos se expandieron, se pudo visualizar un aspecto homogéneo, con células compactas incluso las más cercanas al ovocito.

### **3.2.10. Fecundación *in vitro* (FIV)**

Después de la MIV, se procedió al protocolo de fertilización, el mismo constó de la preparación de las columnas de Percoll, Se tomó 450 ul de Percoll puro en un tubo ependorf junto con 50 ul de solución TALP, luego se mezcló mediante pipeteo, consiguiendo así la columna con una concentración de 90%. Posteriormente se aspiró 167,6 ul, de la columna de Percoll de 90% y se colocó en otro tubo ependorf se absorbió al 60% 82,5 ul, se tomó el contenido de la primera columna y se colocó en un tercer tubo ependorf al 30%. 82,5 ul de solución FIV fue colocada en la segunda (60%), dicha solución fue colocada en una cantidad de 167,6 ul en la tercera columna.

Para elaborar las columnas de Percoll se tomó 200 ul de solución de cada tubo y se depositó en un tubo común, primero, la solución al 30%, luego al 60% fue colocada lentamente en el fondo del tubo y por último la solución al 90%.

A continuación, se descongeló la pajuela, se tomó 200 ul de semen y fue depositado lentamente en la parte superior del tubo ependorf, centrifugar durante 10 minutos. Durante el tiempo de centrifugación los COC's fueron lavados tres veces en el medio de fertilización (TALP, 6) y posteriormente, fueron transferidos desde el medio de maduración en grupos de 10-12 a gotas de 45 µl que contenía medio de fertilización, además, de preparar un tubo ependorf con 95 ul de agua.

Transcurrido 10 minutos se tomó 200 ul de sedimento o pellet del fondo del tubo y se colocó en medio FIV para la segunda centrifugación de lavado. Una vez centrifugado, se colocó 100 ul de pellet en un tubo ependorf.

Para la evaluación seminal, se mezcló en un tubo 5 ul de semen y 95 ul de agua, de esta solución se colocó 10 ul en la cámara de Neubauer y se contabilizó la



cantidad de espermatozoides por cuadrantes. El cálculo del volumen de fertilización fue realizado dividiendo 90  $\mu$ l que es el tamaño de las gotas de medio FIV para el número de espermatozoides contabilizados.

Finalmente se fertilizó las gotitas para después colocar en la cámara de CO<sub>2</sub>. El proceso de inseminación se llevó a cabo añadiendo  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml, 2  $\mu$ g / ml de heparina y PHE (penicilamina, 20  $\mu$ M, hipotaurina, 10  $\mu$ M, epinefrina, 1  $\mu$ M). Los ovocitos se co-incubaron con espermatozoides durante 22-24 horas a 38,5°C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera de aire humidificado.

### **3.2.11. Cultivo *in vitro* (CIV)**

Los posibles cigotos se colocaron en gotas con fluido oviductal sintético (SOF) + HEPES, para ser denudados mediante acción mecánica de pipeteo continuo. Una vez localizados los cigotos se cultivaron en grupos de 10-15 en 50  $\mu$ l de medio de cultivo a 38,5°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>. El clivaje se evaluó después de 48 horas de haber sido fertilizados, mediante observación de aquellos ovocitos que presenten blastómeros. La valoración del número de embriones se realizó el día 8.

### **3.2.12. Variables**

#### *Independientes:*

- Protocolo de estimulación ovárica
- Sesión de OPU

#### *Dependientes:*

- Número de folículos visualizados.
- Número de COC's recuperados.
- Calidad de COC's recuperados.
- Porcentaje de maduración
- Porcentaje de clivaje
- Número de embriones

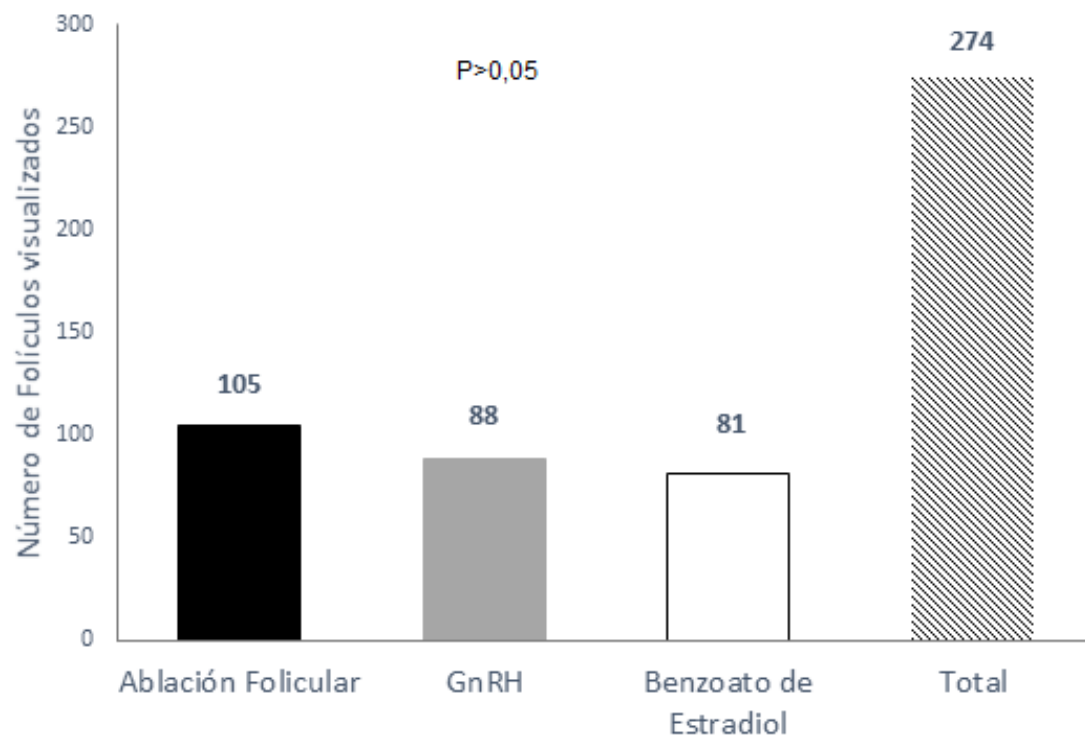


### **3.2.13. Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS versión 24.

Se obtuvieron estadígrafos principales. Para la comparación de variables cuantitativas se realizó un ANOVA, y para comparar medias se ejecutó la prueba de Tukey al 5%.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

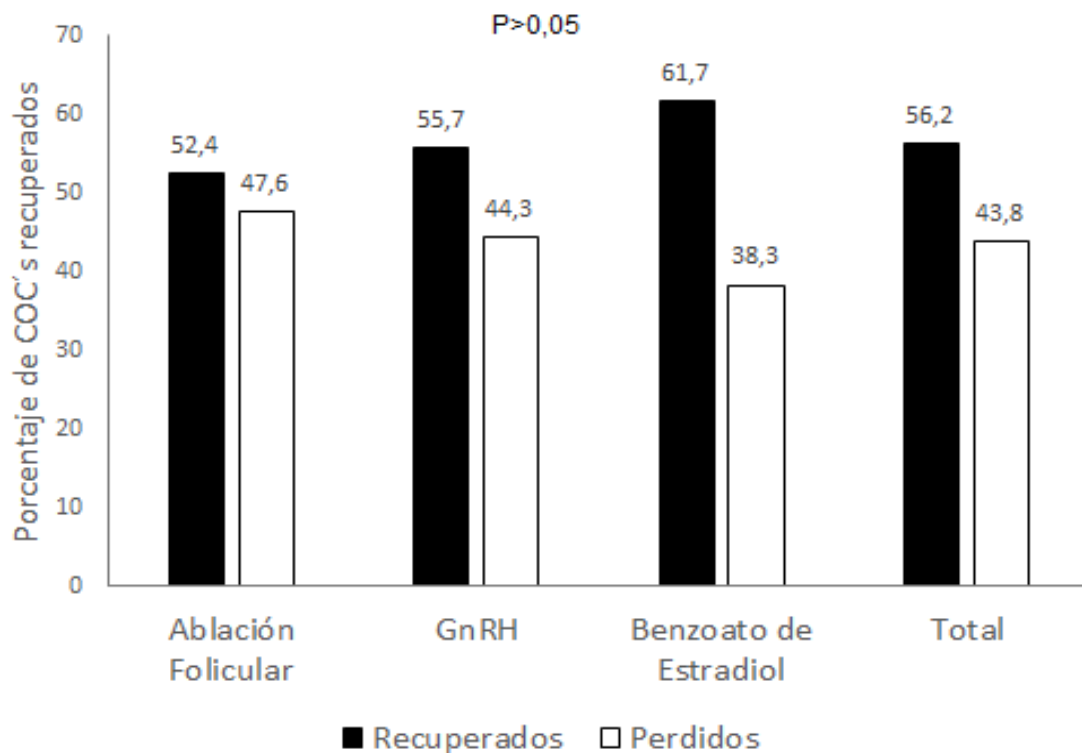


**Figura 2:** Respuesta al proceso de estimulación ovárica en cada tratamiento expresado en número total de folículos visualizados en todo el experimento.

Previo a la investigación se aplicaron tres tratamientos de reinicio de onda folicular (G1=Ablación folicular; G2= GnRH; G3=Benzoato de estradiol), seguidos de estimulación ovárica con 500 UI de FSH-LH (Pluset®) y 48h posteriores se realizó OPU. Se determinó que la respuesta a la estimulación ovárica en los tres tratamientos no presentó diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ), (**Figura 2**).

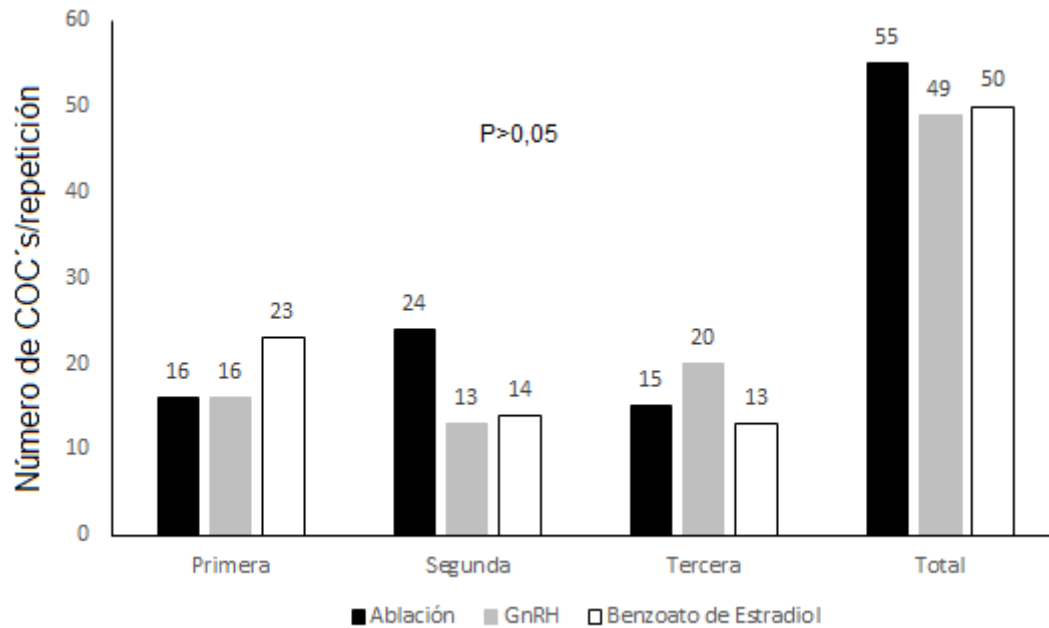
Las sesiones de OPU permitió obtener un porcentaje de recuperación de COC's similares entre los tres tratamientos (**Figura 3**), estos valores son concordantes con los obtenidos por Alvarado *et al.* (45), quienes al utilizar 4 vacas Holstein sometidas a veinte y cuatro sesiones de OPU, realizando dos aspiraciones por semana, durante doce semanas, obteniendo una tasa de recuperación de 56.3%. Así mismo Ruiz *et al.* (35) sincronizaron la onda folicular administrando 0.2 mg vía intramuscular de GnRH (día 0), seguido por la aplicación de 500 UI de FSH-LH intramuscular, 48h más tarde realizaron OPU (día 2) obteniendo un

porcentaje de 56.7%. Sin embargo, otros autores como Samaniego *et al.* (9) describen un 80.3% de recuperación, de COC's al realizar estimulación con FSH-LH (Pluset®) y OPU 48 horas después, esto en bovinos criollos del Ecuador. Dato que concuerda con lo descrito por Chasombat *et al.* (46) al evaluar ganado criollo tailandés, aplicando dosis única intramuscular de 100 mg FSH-p a cuatro tratamientos en tiempos distintos, logrando una tasa de recuperación del 80.83%. Esta diferencia podría ser atribuible de acuerdo a los autores al genotipo racial utilizado en las dos investigaciones en mención.



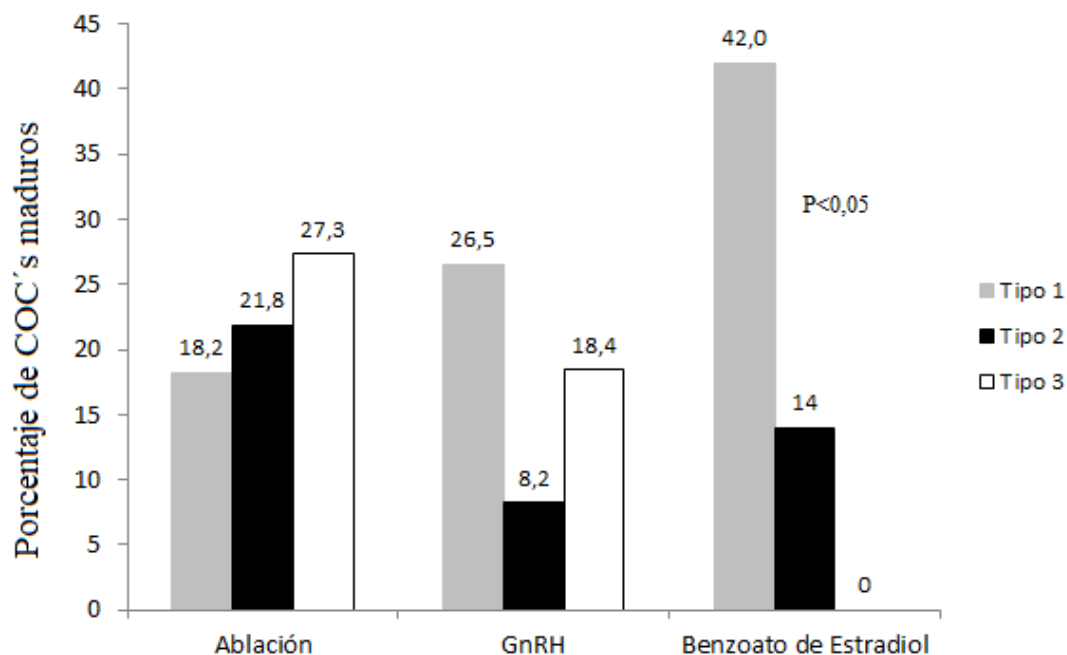
**Figura 3:** Porcentaje de COC's recuperados en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%.





**Figura 4:** Número de COC's puestos a madurar *in vitro* (MIV), por repetición en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%.

El número de COC's provenientes de cada tratamiento: Ablación folicular (G1=55), GnRH (G2=49), y Benzoato de estradiol (G3=50) fueron estadísticamente similares. Este número de complejos cumulus ovocitos (COC's) fueron obtenidos durante tres repeticiones para cada tratamiento. La investigación inicio con este número de COC's en cada grupo experimental (figura 4).

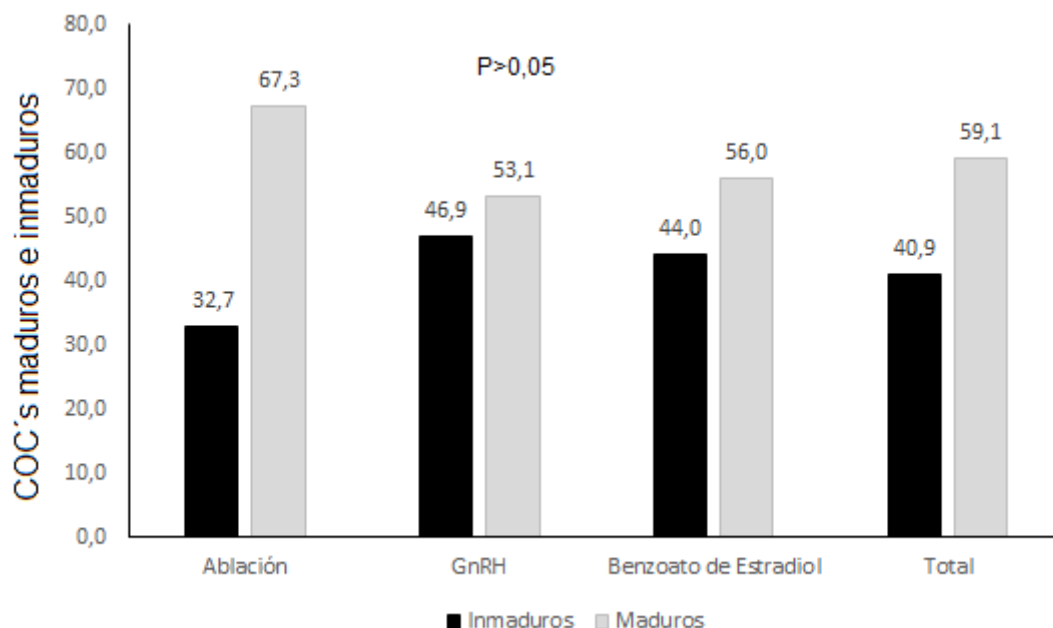


**Figura 5:** Porcentaje de COC's maduros en cada tratamiento, clasificados de acuerdo a lo descrito por Lorenzo et al., (1994), en cuanto al grado de expansión de las células del cúmulus: Tipo 1 (mínima expansión); Tipo 2 (expansión moderada); Tipo 3 (Expansión máxima). Prueba de Tukey al 5%

El grado de maduración fue catalogado en base a un estudio realizado por Lorenzo et al. (44), que compararon cuatro tratamientos para valorar la maduración adicionando factores de crecimiento (EGF, IGF-I).

Los criterios utilizados para describir la expansión del cúmulus fue un sistema de puntuación subjetivo en el que: 0 no indicó respuesta detectable; tipo uno (+) mínima respuesta observable, tipo dos (++) significó expansión moderada y tipo tres (+++) grado máximo de expansión, donde todas las capas de cúmulus se expandieron, incluso las más cercanas al ovocito.

Al evaluar el porcentaje de COCs que alcanzaron el estado de maduración en los tres tratamientos se encontró diferencia estadística ( $P < 0,05$ ), exclusivamente en el tratamiento tres, Benzoato de estradiol (G3), en el cual se observó un mayor porcentaje de COCs tipo 1 (42%).

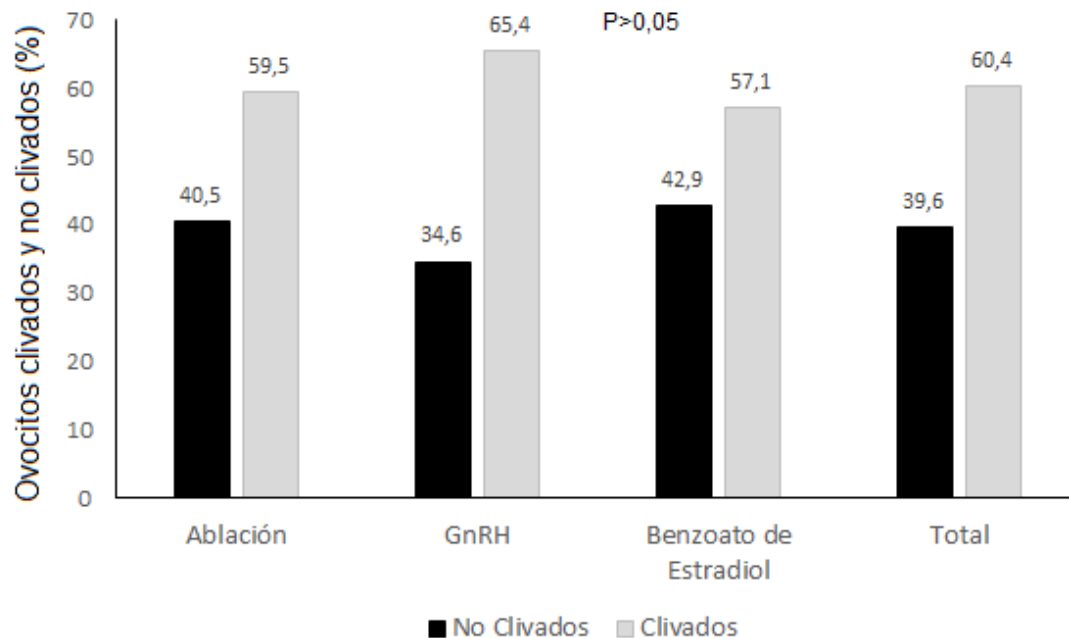


**Figura 6:** Porcentaje de COC's clasificados como maduros e inmaduros luego del proceso de MIV, en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%

Se obtuvo un porcentaje global de maduración del 59.1% al final de la evaluación, valores muy cercanos fueron establecidos por Ruiz *et al.* (35) en vacas de genotipo Murciano-Levantine obtiene un promedio de 53%. Además, no se encontró diferencias significativas al evaluar los porcentajes de maduración *in vitro* ya que los tres tratamientos se comportan de manera similar. Sin embargo se obtuvo resultados semejantes a los logrados por autores como Bhojani *et al.* (47) que obtiene un 54% de maduración al evaluar la eficiencia de la producción de blastocisto a partir de la selección de ovocitos competentes colocados en medio de maduración, basado en el grado de expansión de las células del cumulus.

Karami *et al.* (48) determinaron porcentajes de maduración cercanos al 90% al evaluar los efectos de la presencia de cuerpo lúteo y diferentes tamaños foliculares en el desarrollo potencial de ovocitos, en vacas Holstein Friesian, superando así los porcentajes obtenidos en la presente investigación. Así también Briseño *et al.* (49) destacan que un 67% de ovocitos maduros se mantienen viables luego de ser sometidos a procesos de vitrificación. Así mismo Segura *et al.* (50) al evaluar la capacidad de maduración de ovocitos provenientes de tres tamaños foliculares 1-2 mm, 2-3mm y 5-6 mm, obtiene

porcentajes de maduración de 89% y 85% para los dos primeros grupos, resultados que están muy por encima de los obtenidos en nuestro estudio.

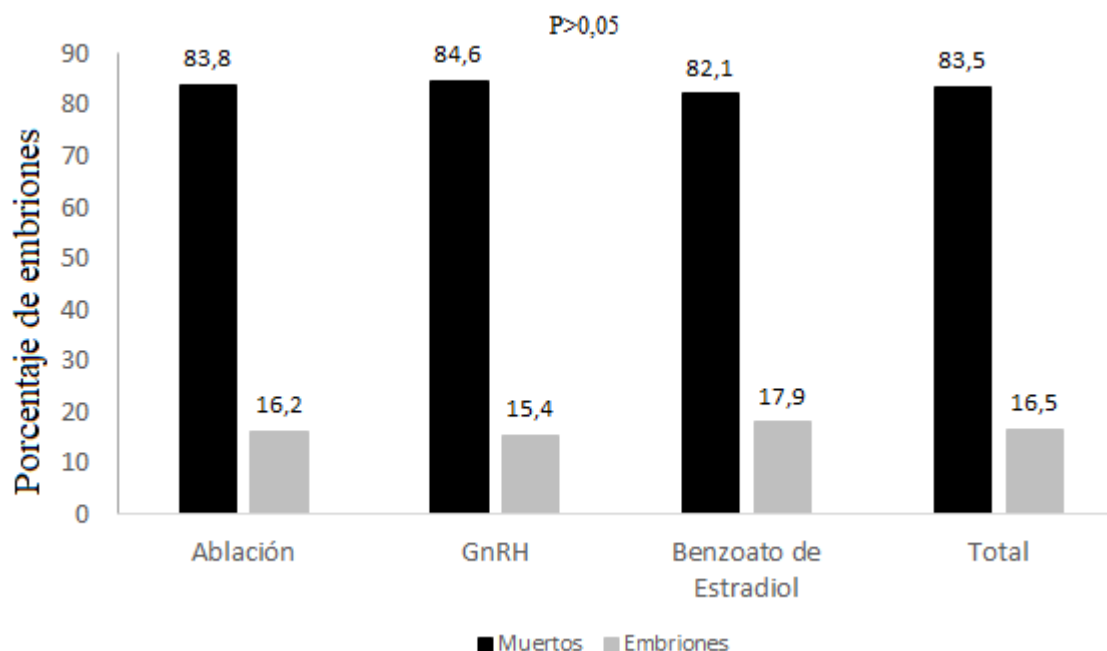


**Figura 7:** Porcentaje de COC's que se dividieron (clivaron) luego de la FIV, en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%

La presente investigación, el porcentaje de ovocitos clivados a lo largo del experimento fue de 60,4%; además, al realizar la evaluación del clivaje entre los tratamientos se pudo observar que no existe diferencia significativa ( $P>0.05$ ). Sin embargo, existe una diferencia numérica en el tratamiento con GnRH (65,4%) en el mismo presenta mayores porcentajes de ovocitos clivados en comparación con el grupo de ablación (59.5%) y benzoato de estradiol (57.1%). Sumando los resultados de maduración y clivaje se puede determinar que existen más ovocitos viables en el grupo de ablación folicular. Estos datos superan a los obtenidos por Ruiz *et al.* (35), que en su investigación obtiene tasas de división observadas del 40%.

Otros autores como Chasombat *et al.* (46) obtuvieron porcentajes de ovocitos clivados entre 81 y 93% en sus cuatro tratamientos mediante la aplicación de FSH a distintas horas (24 y 36 horas) y OPU a distintos tiempos (72 y 96 horas)

en sus cuatro tratamientos, consiguiendo resultados que están muy por encima del presente trabajo. Una de las causas de esta variación podría ser el número de animales y raza empleada en la investigación.



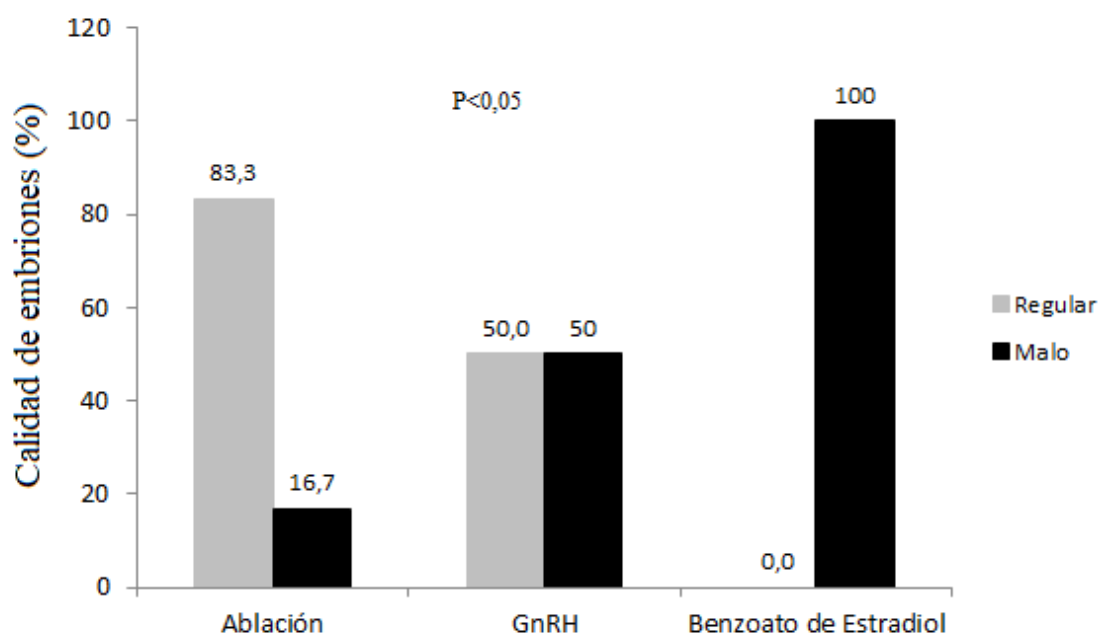
**Figura 8:** Porcentaje de embriones en cada tratamiento generados al final del experimento. Prueba de Tukey al 5%.

El porcentaje de embriones proveniente de los tratamientos de Ablación folicular (16,2%), GnRH (15,4%), y Benzoato de estradiol (17,9%), fueron similares evidenciando la inexistencia de diferencias estadísticas significativas, obteniendo un porcentaje al final de experimento de 16.5%. Los porcentajes de embriones de la presente investigación están por debajo de los obtenidos por autores como Ruiz *et al.* (51) que obtuvieron un 20% de embriones luego de la sincronización de la onda folicular. Así mismo Chaubal *et al.* (33) obtuvieron valores cercanos al utilizar vacas Angus sometidas a la eliminación del folículo dominante, seguido de la aplicación de FSH y OPU 48 horas después, lograron un porcentaje del 20% de embriones.

Por su parte Roover *et al.* (50) determinaron porcentajes de 28% de embriones después de realizar un protocolo de estimulación que consistió en la inserción de un implante de oreja que contenía 3 mg de valerato de estradiol 8 días antes de la punción (día 8), posteriormente la eliminación folículo dominante por

punción de folículo guiada por ultrasonido al día 6. La aplicación de FSH día 2 y día 3, dos veces al día (8 am a 8 pm), es decir una dosis total de 160 µg de FSH y 40 µg de LH por donante por ciclo de estimulación, seguido de OPU 48 h después de la última inyección de FSH (día 0), los resultados obtenidos son muy superiores a los obtenidos en el presente estudio.

Sin embargo Karami *et al.* (48) obtuvieron porcentajes de 41%, al obtener ovocitos provenientes de folículos de tamaños entre 10 a 20 mm, resultados que superan a los obtenidos en el presente estudio, resultados similares fueron los conseguidos por Chasombat *et al.* (46) quienes obtuvieron porcentajes entre 30 a 40% de embriones en sus cuatro grupos experimentales.



**Figura 9:** Porcentaje de embriones de calidad regular y malos producidos en cada tratamiento. Prueba de Tukey al 5%

Al final de la investigación los embriones fueron catalogados de regular y mala calidad, basado en la morfología, uniformidad de la membrana celular, simetría de los blastómeros, restos celulares en el espacio previtelino, apariencia y tonalidad del embrión. Los puntos antes mencionados valoran la calidad embrionaria y viabilidad. (52) Por lo tanto al analizar el porcentaje de calidad de



embriones producidos en cada tratamiento no se logró obtener ningún embrión catalogado como excelente y bueno, es decir transferible. En el tratamiento de Ablación folicular del total de embriones obtenidos un 83,3% fue catalogado como regular superando ( $P < 0,05$ ) en gran medida a los demás tratamientos.



## 5. CONCLUSIONES

- Los tres tratamientos (Ablación, GnRH, Benzoato de estradiol) de reinicio de la onda folicular en vacas Holstein mestizas proporcionan similares porcentajes de embriones producidos *in vitro*.
- Al final de experimento se obtuvo embriones de calidad regular, El tratamiento de Ablación folicular, permite recuperar COC's que proporcionan embriones de mejor calidad con relación a los tratamientos con GnRH o con Benzoato de estradiol.
- La efectividad del proceso de producción *in vitro* de embriones valorada mediante el porcentaje de maduración y clivaje es similar en los tratamientos empleados.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Diaza Gonella MÁ, Bustos Atuesta EJ, Ulloa Bernal MS, Jaramillo Chacón L. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Investig Agrar y Ambient*. 2013;4(1):65–80.
2. Alvarado Ulloa JM. Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. 2016;69.
3. Gonzales Mauricio. Ecto de dos fuentes de progesterona exogena, sobre la ovulacion (cantidad de folículos ovulados) en vacas criollas san martineras, sobrestimuladas con FSH-P LH-P (PLUSET®). 2011;74.
4. Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, et al. Comparación de diferentes protocolos OPU para optimizar la recuperación de ovocitos y producción de embriones durante un periodo de 10 semanas. 2005;
5. Stevenson A. Producción in vitro de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. *Oxford Dictionaries*. 2010;25–32.
6. Eugenio V, Rojas H, Villa-Godoy A, Ponce H, Vázquez C. Influencia estacional sobre el ciclo estral y el estro en hembras Cebu mantenidas en clima tropical. *Técnica Pecu en México*. 2000;38(2):89–103.
7. Duica A, Tovío N, Grajales H. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Rev Med Vet (Bogota)*. 2007;(14):107–124.
8. Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. CES medicina veterinaria y zootecnia. Universidad CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia;
9. Xavier S. Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up ( OPU ) en tiempos diferentes , luego de la estimulación ovárica con. 2017.



10. Baez Francisco, Chavez Adeymi, Hernandez Hugo, Villamediana Patricia. Evaluacion de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotipica Bos taurus y Bos indicus. 2010;xx:9.
11. Rippe C. El Ciclo Estral. Dairy Cattle Reprod Conf. 2009;(March 2015):111–6.
12. Palomares García SR. Revisión de los protocolos empleados en la sincronización de celos en bovinos. 2009;164.
13. Becaluba F. Factores que afectan la superovulación en bovino. Sitio Argentino Prod Anim. 2007;1–18.
14. Gutiérrez JC. Hormonas de la reproducción bovina. Desarro Sosten Ganad Doble Propósito. 2008;515–30.
15. Díaz T del V. Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble proposito. 1998;(1960).
16. Brito Capallejas R. Fisiología de la reproducción animal con elementos de biotecnología. 2nd ed. La Habana: Editorial Félix Varela; 2009. 253 p.
17. Darío L. Evaluacion de la eficiencia del uso de un nuevo dispositivo intravaginal impregnado con progesterona para la sincronizacion de celos y ovulación en vacas de carne. 2013;
18. Delgado P, Ramos N, González C, Rojas E. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. Vet y Zootec. 2011;5(2):88–99.
19. Gustavo P. Biotecnologia de la Reproduccion. Segunda. Mar del Plata; 2008. 670 p.
20. Marg A, Delhi N. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. 1996;(96):121–30.
21. Cooper B, Schafer AI, Puchalsky D, Handin RI. Desensitization of prostaglandin - activated platelet adenylate cyclase. 1979;17(4):561–71.
22. Jose K, Nicolas W, Joel K. Inseminación artificial en bovinos. 2017;
23. Pursley, Mee, Wiltbank. Synchronizationof ovulation in dairy cows using



- PGF2 and GnRH. 1995;(95):4–7.
24. Bó, Baruselli, Cutaia, Caccia, Tríbulo. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. 2002;(01).
  25. Leonardo P. Evaluación de la respuesta superovulatoria utilizando la ablación folicular como alternativa para la inducción del crecimiento de una nueva onda folicular en donadoras Brahman. 2011;
  26. Wubisheta A, Graves CN, Spahr SL. Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows. 1986;25(3):423–7.
  27. Feresín. Manejo farmacológico del ciclo estral del bovino. 2005;1–5.
  28. Pieterse, Kappen. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultraosund scanning of the ovaries. 1988;30(4):751–62.
  29. Bousquet, Bell, Durocher, Smith. Aspirated from large follicles in superovulated heifers. :172.
  30. Hafez. E. Reproducción e inseminacion artificial. Mexico D.F: Mc Graw- Hill Interamericana; 2002.
  31. Kastelic JP, Ginther OJ. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. Anim Reprod Sci. 1991;26(1–2):13–24.
  32. Bols PEJ, Jorssen EPA, Goovaerts IGF, Langbeen A, Leroy JLMR. High throughput non-invasive oocyte quality assessment : the search continues. 2012;420–5.
  33. Chaubal S, Molina J, Ohlrichs C, Ferre L, Faber D, Bols P, et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. Theriogenology. 2006 May;65(8):1631–48.
  34. Gustavo P. Biotecnología de la Reproduccion. segunda. Mar de Plata: Pugliese y Siena; 2008. 670 p.
  35. Ruiz S, Astiz S. Producción in vitro de embriones (PIV) en biotecnología de la reproduccion bovina. Asoc Nac Espec Med Bov en España.



2010;9(1):25–32.

36. Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA. El intervalo de tiempo entre la administracion de FSH-P y la matanza puede influir en la competencia de desarrollo de los ovocitos de ganado vacuno. 1997;1:5.
37. López SR. Palomo OVUM PICK UP ( OPU ) en bovinos : Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. 2009;(January 2010):58–63.
38. Thomson Gale (Firm) FJ, Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. División de Investigación. AC, Hernández Fonseca HJ, Villamediana Monreal PC. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. [Internet]. Vol. 20, Revista Científica. UNIVERSIDAD DEL ZULIA; 2010 [cited 2018 May 21]. 259-267 p. Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592010000300007&script=sci\\_arttext&lng=en](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592010000300007&script=sci_arttext&lng=en)
39. Peláez VA. Producción in vitro de embriones bovinos. Universidad de Cuenca. 2011.
40. Berg U, Reichenbach H. Produccion in vitro de embriones. In: Biotecnologia de la Reproduccion. Mar del Plata: INTA; 2008. p. 120–39.
41. Morante MCF, López BC. Universidad De Santiago De Compostela ( España ). 2003;1–7.
42. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. Theriogenology. 1994;41(8):1571–83.
43. Samaniego J, Ayala L, Nieto P, Rodas E, Vazquez J, Murillo Y, et al. Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. Maskana Prod Anim. 2017;8(2):77–80.
44. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. Reproduction [Internet]. 1994;101(3):697–701. Available from:



<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/jrf.0.1010697>

45. Alvarado AE, Gamarra G, Gallegos A. Tasa de recuperación de ovocitos en vacas holstein en descarte. 2016;77(1):63–8.
46. Chasombat J, Nagai T, Parnpa R, Vongpralub T. Dinamica folicular ovárica, crecimiento folicular ovárico, producción de ovocitos, producción in vitro de embriones y recolección repetida de ovocitos en novillas nativas tailandesas sometidas a superestimulación. [cited 2018 Jan 9]; Available from: [http://www.uco.es/organiza/departamentos/anatomia-y-anatopatologica/peques/curso01\\_05/esofago2004.pdf](http://www.uco.es/organiza/departamentos/anatomia-y-anatopatologica/peques/curso01_05/esofago2004.pdf)
47. Bhojwani S, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*. 2007;67(2):341–5.
48. Shabankareh HK, Shahsavari MH, Moghaddam G. En competencia de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos: 13(10):615–22.
49. Yander B, Jenin C, Illes C. Capacidad de desarrollo de ovocitos vitrificados en estadio inmaduro y maduro en bovinos. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect A J Phys Sci*. 2011;66(3–4):242–6.
50. Roover, Hansen, Genicot. Capacidad de maduración in vitro de ovocitos obtenidos de folículos de tres tamaños diferentes en bovinos. 2015;5(1):106–9.
51. Ruiz S, Astiz S, Peinado B, Almela L, Poto A. Aplicación de la Biotecnología Reproductiva para la recuperación de especies amenazadas Razas: nacimiento de la primera cría Bovina de la raza Murciana-Levantina obtenidos por OPU , la producción in vitro de embriones y vitrificación . *Contenido Introduc*. 2013;1–5.
52. Perry G. Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm. *Int Embryo Transf Soc*. 2017;(lvd):1–16.



## 7. ANEXOS

### *Anexo 1 Materiales de laboratorio*



Estereomicroscopio **Fuente:** Autor



Pipetas **Fuente:** Autor



Puntas **Fuente:** Autor



Cámara de Neubauer **Fuente:** Autor



Placa térmica y suero fisiológico **Fuente:** Autor

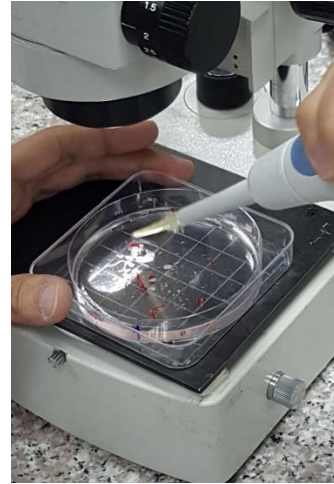




## Anexo 2: Protocolo de recuperación de ovocitos



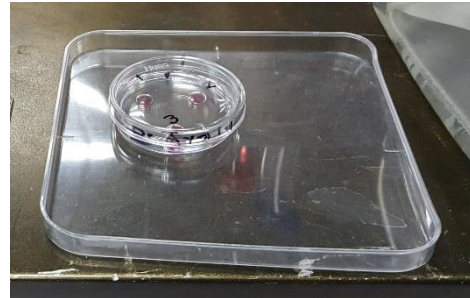
Búsqueda de ovocitos **Fuente:** Autor



Recuperación de COC's **Fuente:** Autor

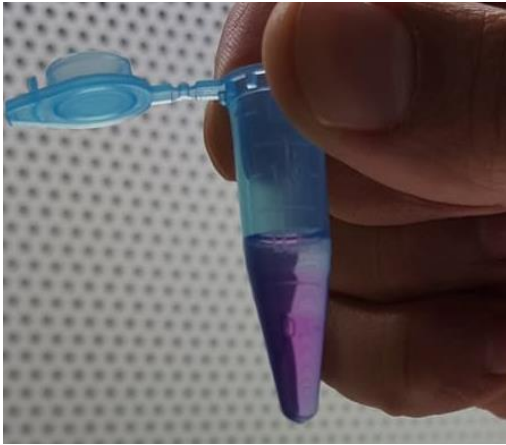


Lavado de los COC's **Fuente:** Autor



COC's en medio de maduración **Fuente:** Autor

### ***Anexo 3: Protocolo de producción in vitro de embriones***



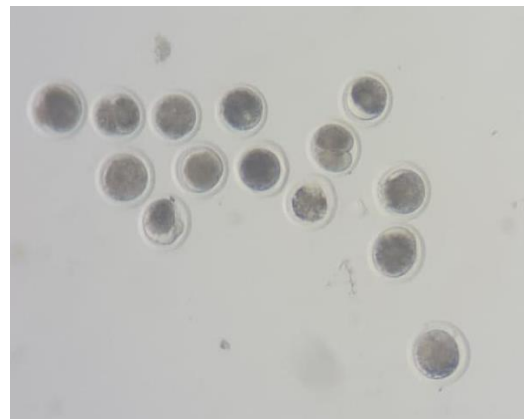
Columnas de percoll **Fuente:** Autor



Inseminación **Fuente:** Autor



Denudado de los posibles cigotos **Fuente:** Autor



Clivaje **Fuente:** Autor